

# Chemical and Pharmacological Studies on Enhancer of Nerve Growth Factor from Medicinal Plants(**薬用植物からの神経成長因子増強物質の探 索およびその作用解析**)

著者	里 萍
号	282
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15310">http://hdl.handle.net/10097/15310</a>

氏 名 (本籍)	里 <sup>り</sup>	萍 <sup>びん</sup>
学 位 の 種 類	博	士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第	2 8 2 号
学位授与年月日	平 成 12 年 9 月 20 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研 究 科、専 攻	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 製薬化学専攻	
学 位 論 文 題 目	Chemical and Pharmacological Studies on Enhancer of Nerve Growth Factor from Medicinal Plants (薬用植 物からの神経成長因子増強物質の探索およびその作 用解析)	
論文審査委員	(主 査) 教授 大 泉 康	教授 大 島 吉 輝
		教授 榎 本 武 美

# 論文内容要旨

高齢化社会を迎え、痴呆症が急増し、その治療薬の開発が急務である。痴呆症はアルツハイマー病および脳血管性痴呆症に大別される。アルツハイマー病で死亡した患者の脳は著しく委縮し、大量の神経細胞が死滅している。これは何らかの原因で神経細胞死がおこり、神経伝達回路網が破壊された結果と考えられている。

神経成長因子 (NGF) は、ニューロンの発生段階における分化、成熟、生存維持に働く物質で、また、神経突起の伸長およびシナプス形成、神経伝達物質の生合成を誘導し、成熟後のニューロンの生存維持にも重要な役割を持つタンパク質として知られている。また、記憶や学習能が低下したラットに NGF を投与すると、これらの機能が改善されることや、抗 NGF 抗体により記憶学習能が低下することも明らかにされている。以上のことから NGF はアルツハイマー病および脳血管性痴呆症を含めて神経脱落的疾患の治療に有効であると考えられ、痴呆症の治療薬としてその応用が期待された。しかしながら、NGF はタンパク質であり、末梢投与した場合、脳血液関門の通過は難しく、さらにプロテアーゼによって加水分解を受けることから、痴呆症の治療薬としての応用は極めて困難なのが現状である。そこで脳血液関門を通過できる低分子性の、NGF 様分化誘導物質、NGF 増強物質および NGF 産生促進物質が痴呆症の治療薬の有用な候補として考えられている。

そこで、本研究においては、PC12D 細胞における NGF による神経突起伸長に対する増強作用を指標にして、薬用植物から NGF 増強物質を独自に探索し、それらの作用機構を解析することを目的とした。

## 1. 薬用植物からの神経成長因子増強物質の探索

### 1) 薬用植物エキスのスクリーニング

まず中国産および南米産薬用植物 17 種のメタノール、酢酸エチルおよび水抽出エキスを調製し、PC12D 細胞における NGF による神経突起伸長に対する増強作用を検討した。その結果、メタノール抽出エキスでは *Gymmopteris rufa* (LINN.) BERNH, *Ruta graveolens* LINN, *Picrorhiza scrophulariiflora* PENNELL に顕著な増強作用が認められた。酢酸エチル抽出エキスでは *Equisetum giganteum* LINN. が最も強い作用を示し、*Gymmopteris rufa* (LINN.) BERNH, *Ruta graveolens* LINN, *Picrorhiza scrophulariiflora* PENNELL に増強作用が認められた。水抽出エキスでは *Nardostachys chinensis*, *Imperata cylindrica*, *Ginseng Radix*, *Gymmopteris rufa* (LINN.) BERNH, *Gochnatia polymorpha* (LESS) CAB, *Picrorhiza scrophulariiflora* PENNELL に弱い作用が認められた。

### 2) 甘松香に含まれる活性成分の単離、構造決定

*N. chinensis* (甘松香) のジクロロメタン抽出エキに含まれる NGF 増強物質の分離を試みた。抽出エキスをシリカゲルカラムにより分画し、得られた各フラクションの活性試験を行った。有用な活性が認められたフラクションを再びカラムクロマトグラフィーにより分画した。カラムクロマトグラフィーとフラ

クシンの活性試験を繰り返し行うことにより、活性物質を得ることに成功した。本化合物の物理化学的性質並びに<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータより本化合物を nardosinone と同定した。

### 3) 胡黄連に含まれる活性成分の単離, 構造決定

*P. scrophulariiflora* (胡黄連) の酢酸エチル抽出エキに含まれる NGF 増強物質の分離を試みた。抽出エキスをシリカゲルカラムにより分画し、得られた各フラクションの活性試験を行った。有用な活性が認められたフラクションを再びカラムクロマトグラフィーにより分画した。カラムクロマトグラフィーとフラクションの活性試験を繰り返し行うことにより、2 種類の活性物質を得ることに成功した。これらの化合物の物理化学的性質並びに<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータより picroside I および picroside II と同定した。

## 2. Nardosinone の NGF 増強作用の解析

PC12D 細胞において nardosinone は単独では神経突起伸長作用を示さなかったが、NGF (2 ng/ml), staurosporine (10 nM) および dbcAMP (0.5 mM) による神経突起伸長を濃度依存的に増強した。Nardosinone (100 μM) は PC12D 細胞における NGF, staurosporine および dbcAMP による神経突起伸長作用の用量作用曲線を左に移動し、さらに最大応答を著しく増大させた。次に nardosinone の NGF 増強作用に対する mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) 阻害剤である PD98059, protein kinase C (PKC) 阻害剤である GF109203X の作用を検討した。PD98059 は NGF (2 ng/ml), staurosporine (10 nM) および dbcAMP (0.5 mM) の神経突起伸長作用にはほとんど影響を与えなかったが、nardosinone による増強作用をほぼ完全に抑制した。さらに nardosinone の NGF 増強作用に対する GF109203X の作用を検討したところ、PD98059 の場合と同様の抑制作用が認められた。これらの結果より nardosinone は NGF の情報伝達経路のうち PD98059 および GF109203X に感受性の経路すなわち PKC-MAPK 経路を増強していることが示唆された。さらに MAPK のリン酸化に対する nardosinone の作用を検討したところ、nardosinone 単独ではリン酸化を引き起こすことなく、さらには、NGF による MAPK のリン酸化を増強しなかった。以上の結果より、nardosinone は PKC-MAPK 依存的なシグナル経路の MAPK よりも下流に作用して NGF 増強作用を発現している可能性が示唆された。さらに、ラット胎児大脳皮質培養細胞に対する低酸素下での nardosinone による生存維持作用を検討したところ、nardosinone 単独で顕著な細胞の生存維持亢進が認められた。この作用メカニズムに関しては不明であるが、NGF 増強作用のメカニズムとは異なると考えられる。

## 3. Picroside I および II の NGF 増強作用の解析

PC12D 細胞において picroside I および II は各々単独では神経突起伸長作用を示さなかったが、NGF (2 ng/ml), staurosporine (10 nM) および dbcAMP (0.3 mM) による神経突起伸長作用を濃度依存的に増強した。Picroside 類 (100 μM) は PC12D 細胞における NGF, staurosporine および dbcAMP による神経突起伸長作用の用量作用曲線を左に移動し、さらに最大応答を顕著に増大させた。Picroside 類の NGF 増強作用に対する

PD98059 および GF109203X の作用を検討した。PD98059 は picroside 類による増強作用をほぼ完全に抑制した。さらに picroside 類の NGF 増強作用に対する GF109203X の作用を検討したところ、PD98059 の場合と同様の抑制作用が認められた。このことより picroside 類は NGF の情報伝達経路のうち PKC-MAPK 経路を増強していることが示唆された。

次に MAPK のリン酸化に対する picroside 類の作用を検討したところ、単独ではリン酸化を引き起こさなかった。さらに picroside 類は NGF による MAPK のリン酸化を増強しなかった。以上の結果より、picroside 類は PKC-MAPK 依存的なシグナル伝達経路の MAPK よりも下流に作用して NGF 増強作用を発現している可能性が示唆された。

#### 4. まとめ

17 種類の中国産および南米産薬用植物のメタノール抽出エキスにおける NGF 増強作用を検討したところ、*Gymmopteris rufa* (LINN.) BERNH, *Ruta graveolens* LINN., *Picrorhiza scrophulariiflora* PENNLL および *Nardostachys chinensis* 等のエキスに顕著な NGF 増強作用が認められた。有用な活性が認められた *N. chinensis* (甘松香) および *P. scrophulariiflora* (胡黄連) のジクロロメタンおよび酢酸エチルエキスより NGF による神経突起伸長に対する増強作用を指標にして活性物質を探索したところ甘松香から nardosinone を、胡黄連から picroside I および II を得ることに成功した。Nardosinone および picroside 類は単独では神経突起伸長作用を示さなかった。しかしながら、nardosinone および picroside 類は NGF による PC12D 細胞における神経突起伸長作用を濃度依存的に増強した。さらに staurosporine および dbcAMP による PC12D 細胞の神経突起伸長に対する nardosinone および picroside 類の作用を検討したところ、いずれの場合も濃度依存的な増強が認められた。Nardosinone および picroside 類の突起伸長促進作用は PD98059 および GF109203X によって完全に阻害された。Nardosinone および picroside 類の NGF による MAPK のリン酸化に及ぼす影響を検討したところ、いずれの場合も MAPK リン酸化の増強は認められなかった。以上の結果より、本研究においては、NGF 増強作用を有する有用な薬用植物を見出し、活性物質として nardosinone および picroside I および II を単離することに成功した。さらに、得られた化合物の作用解析を行ったところ、nardosinone および picroside I および II は NGF あるいは NGF 様物質による神経突起の伸長に対して増強作用を示し、これらの化合物が PKC-MAPK 依存性経路の MAPK よりも下流に作用している可能性が示唆された。これらの化合物は NGF の作用増強物質として、痴呆症の治療薬のリード化合物としての応用が期待される。

## 審査結果の要旨

高齢化社会を迎え、脳血管性痴呆症およびアルツハイマー病などの痴呆症が急増し、それらの治療薬の開発が望まれている。神経成長因子（NGF）はニューロンの分化、成熟、生存維持に働く物質で、痴呆症の治療薬としてその応用が期待された。しかし、NGFはタンパク質のため脳血液関門の通過は難しく、またプロテアーゼによって加水分解されることから、治療としての応用は極めて困難なのが現状である。従って、低分子化合物でNGF活性を有するもの、NGF分泌を促進するものあるいはNGFの作用を増強するものが痴呆症の治療に有用であると考えられている。そこで、薬用植物からNGFを増強する物質を探索し、それらの化合物の作用機構を解明する研究を行なった。

本研究においては中国産および南米産薬用植物の抽出エキスを調製し、PC12D細胞におけるそれらのNGF増強作用を検討した。その結果、*Nardostachys chinensis*, *Equisetum giganteum*, *Gymmopteris rufa*および*Picrorhiza scrophulariiflora*の酢酸エチルエキスを顕著なNGF増強作用が認められた。その中で*N. chinensis*（甘松香）、*P. scrophulariiflora*（胡黄連）の酢酸エチルエキスよりNGFによる神経突起伸長に対する増強作用を指標にして活性物質を探索したところ甘松香から nardosinone を、胡黄連から picroside I および picroside II を得ることに成功した。

そこで、これらの3種のNGF増強物質の作用メカニズムをPC12D細胞を用いて詳細に検討した。Nardosinone, picroside I および picroside II は各々単独では神経突起伸長作用を示さなかったが、NGF, staurosporine および dibutyryl cyclic AMP による神経突起伸長作用を増強した。これら化合物の神経突起伸長増強作用は、PD98059 および GF109203X によって阻害された。Nardosinone, picroside I および picroside II のNGFによるMAP kinaseのリン酸化に及ぼす影響を検討したところ、いずれの場合もMAP kinaseリン酸化の亢進は認められなかった。さらに、nardosinoneのラット胎児大脳皮質細胞に対する低酸素下での細胞の生存維持作用を検討したところ、顕著な細胞の生存維持作用が認められた。

以上の結果より、nardosinone, picroside I および picroside II はNGFあるいはNGF様物質による神経突起伸長の増強作用を示し、その作用にはPKCやMAP kinaseが介在する可能性が示唆された。これらの化合物はNGFの作用増強物質として、痴呆症の治療へ向けたリード化合物になるものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。